

1969

**ÜBER DIE PRÄPARATION
GRUPPENSPEZIFISCHER ANTISEREN GEGEN
B-HÄMOLYTISCHE STREPTOKOKKEN UND IHRE
DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
HANS-JOACHIM SONNTAG
aus
GEILENKIRCHEN

BONN 1969

ÜBER DIE PRÄPARATION
GRUPPENSPEZIFISCHER ANTISEREN GEGEN
B-HÄMOLYTISCHE STREPTOKOKKEN UND IHRE
DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
HANS-JOACHIM SONNTAG
aus
GEILENKIRCHEN

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. O. H a f e r k a m p

Korreferent: Professor Dr. H. H a m p e r l

Tag der mündlichen Prüfung: 28.4.1969

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
B o n n

Lehrplan

1. Ziele und Aufgaben

2. Inhalte und Themen

1. Einführung des Schülers in die Welt der Kunst und in die Kunst der Welt

2. Einführung in die Kunst der Welt

- a. Einführung in die Kunst der Welt
- b. Einführung in die Kunst der Welt
- c. Einführung in die Kunst der Welt

3. Einführung in die Kunst der Welt

a. Einführung in die Kunst der Welt

Meinen Eltern

b. Einführung in die Kunst der Welt

c. Einführung in die Kunst der Welt

4. Einführung in die Kunst der Welt

a. Einführung in die Kunst der Welt

b. Einführung in die Kunst der Welt

c. Einführung in die Kunst der Welt

d. Einführung in die Kunst der Welt

e. Einführung in die Kunst der Welt

5. Einführung in die Kunst der Welt

a. Einführung in die Kunst der Welt

b. Einführung in die Kunst der Welt

c. Einführung in die Kunst der Welt

6. Einführung in die Kunst der Welt

a. Einführung in die Kunst der Welt

b. Einführung in die Kunst der Welt

c. Einführung in die Kunst der Welt



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

A. Einleitung und Ziel der Arbeit

B. Material und Methodik

- I. Herstellung von Antiseren gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A, C und G
 1. Antigenpräparation
 - a) Kulturelle Gewinnung der Bakterien
 - b) Antigenherstellung nach dem Lancefield-Verfahren
 - c) Antigenherstellung nach Ultraschall-Verfahren
 2. Immunisierung der Kaninchen
 - a) Auswahl der Versuchstiere
 - b) Immunisierungsschema
 - c) Blutentnahme zur Bestimmung der Antikörperbildung (Agglutinine, Präcipitine) während des Immunisierungsvorganges
 - d) Gewinnung der Antiseren
- II. Untersuchung der gewonnenen Antiseren
 1. Bakterienagglutinationstest
 2. Präcipitationstest
 - a) Lancefield-Methode
 - b) Ultraschall-Methode
 3. Gesamteiweißbestimmung und Papierelektrophorese
- III. Immunofluoreszenz-Verfahren
 1. Kopplung der Gesamtseren und Blockierung
 2. Ausstrichvorbereitung und Färbung
 3. Kontrollen
- IV. Praktische Anwendung der Immunofluoreszenz-Methode bei der Gruppenbestimmung unbekannter Streptokokkenstämme
 1. Abstrich und Kultur
 2. Immunofluoreszenz

C. Ergebnisse

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

F. Literaturangaben

A. Einleitung und Ziel der Arbeit

1928 entdeckte LANCEFIELD in den Zellwänden β -hämolytischer Streptokokken polysaccharidreiche Antigene, die eine serologische Untergliederung in verschiedene Gruppen erlaubten. Mit Hilfe dieser spezifischen Polysaccharide, der sogenannten C-Carbohydrate, ließen sich die β -hämolytischen Streptokokken zunächst in fünf Gruppen einteilen, welche die Bezeichnung A, B, usw. erhielten. Mittlerweile sind - einschließlich N - 14 derartige Gruppen bekannt (BURROWS, 1963). In der Folgezeit wurden aber auch weitere Antigene der Bakterienwand aufgedeckt: das typenspezifische M-Protein, welches eine Untergliederung der β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A in 42 Typen möglich macht, das sogenannte T-Antigen, das nur bei einzelnen Typen auftritt und typenspezifisch sein kann und ein mit R bezeichnetes Antigen, welches ebenfalls nicht regelmäßig und nur bei einzelnen Typen vorkommt. Beide, T-Antigen und R-Antigen, sind ihrer chemischen Natur nach Proteine.

Die Entdeckung der gruppenspezifischen Carbohydrate, deren antigene Wirksamkeit Grundlage der vorliegenden Arbeit ist, hat sich insofern als sehr wichtig erwiesen, als man fand, daß der größte Anteil β -hämolytischer Streptokokken, die beim Menschen Krankheiten hervorrufen, der serologischen Gruppe A zuzuordnen sind (BURROWS, 1963). So stellt EVANS (1944) fest, daß unter 232 von Scharlachkranken isolierten Streptokokkenstämmen 229 (98,7 %) der serologischen Gruppe A angehörten und nur 3 der Gruppe C. β -hämolytische Streptokokken, welche man bei Patienten mit Tonsillitis, septischer Halsentzündung, rheumatischem Fieber und Polyarthritidis rheumatica fand, ließen sich zu 100 % in die Gruppe A einordnen (BURROWS, 1963).

Die Bedeutung der Gruppenbestimmung β -hämolytischer Streptokokken wird noch deutlicher, wenn man das Problem der Streptokokkenkrankheiten mitberücksichtigt. RAMMELKAMP (1952) konnte in umfangreichen und langwierigen Untersuchungen zeigen, daß sich nach unbehandelten Streptokokkeninfektionen in etwa 3 % der Fälle ein akutes rheumatisches Fieber entwickelt. WAHRER (1908), HANSBORG (1925) und Mc MILLAN (1946) fanden weiterhin, daß bei 0,03 - 18%

eine akute hämorrhagische Glomerulonephritis in der Folge eines Streptokokkeninfektes auftritt. In fast allen Fällen von rheumatischem Fieber und akuter Glomerulonephritis waren die isolierten β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A zugehörig.

Der ätiologische Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen und dem vorhergehenden Streptokokkeninfekt wird daher heute kaum noch angezweifelt (CHRIST, 1959).

Es gibt grundsätzlich zwei Methoden der Gruppenbestimmung β -hämolytischer Streptokokken. Das gebräuchlichste und routinemäßig angewandte Verfahren ist der Präcipitintest mit einem Salzsäureextrakt (LANCEFIELD, 1928) von dem zu bestimmenden Streptokokkenstamm. Als Testreagenz dient ein gruppenspezifisches Antiserum vom Kaninchen.

Eine zweite, neuerdings häufiger angewandte Methode beruht auf der Anwendung fluoreszierender Antikörper (COONS und KAPLAN, 1950). Die letztgenannte Technik wurde von SMITH (1965) als Schnellverfahren für das klinische Labor vervollkommenet.

Es soll der Zweck dieser Arbeit sein, die günstigsten Voraussetzungen für die Herstellung, Gewinnung und Kopplung von hochwertigen gruppenspezifischen Antisera gegen β -hämolytische Streptokokken herauszufinden. Außerdem ist zu prüfen, ob das von COONS und KAPLAN sowie SMITH entwickelte Verfahren gegenüber dem allgemein gebräuchlichen Präcipitintest Vorteile aufweist.

B. Material und Methodik

I. Herstellung von Antisera gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A, C und G.

1. Antigenpräparation

a) Kulturelle Gewinnung der Bakterien

β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A, C und G (Stamm J17/A4 = A, T 12/126 = A, C74 = C und D 166B = G des Rockefeller-Institu-

tes, New York sowie Stamm 7KK = A und 196 = A des Pathologischen Institutes, Bonn) wurden in je 1500 ml Todd-Hewitt-Brühe (Difco Laboratories, Detroit 1 Michigan USA) 18 - 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in Zentrifugenröhrchen gesammelt, abzentrifugiert (3000 U/Min., 10 Min. lang), zweimal in steriler physiologischer NaCl gewaschen und anschließend in einem 56°C Wasserbad für 30 Min. inaktiviert.

b) Antigenherstellung nach dem Lancefield-Verfahren

Die unter I.1.a) beschriebene Suspension inaktivierter Bakterien wurde nun erneut zentrifugiert und das Sediment in je 25 ml einer Pepsinsalzsäure-Lösung (1 mg krist. Pepsin/ml einer 0,01 N HCl) suspendiert. Das pH wurde mit steriler HCl auf 2 eingestellt und die Bakteriensuspension zwei Stunden in ein 37°C Wasserbad gebracht. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Bakterien nun in steriler physiologischer NaCl aufgeschwemmt, mit steriler NaOH neutralisiert und wiederum gewaschen. Die mit steriler physiologischer NaCl hergestellte, injektionsfertige Bakteriensuspension hatte im Beckmann Spektro-Photometer in der 10 mm Küvette bei einer Wellenlänge von 500 mμ eine optische Dichte von 1. Die Antigenaufschwemmungen wurden in Serumfläschchen steril abgefüllt und bei 0 - 4°C im Kühlschrank verwahrt (LANCEFIELD, 1955).

c) Antigenherstellung nach Ultraschall-Verfahren

Verwendet wurden hier die Stämme J17/A4 und T12/126. Die kulturelle Gewinnung, der Waschvorgang und die Inaktivierung erfolgte wie unter I.1.a) angegeben. Anschließend wurde das Sediment von je 1500 ml Brühe in je 8 - 10 ml physiologischer NaCl suspendiert und unter Eiswasserkühlung 15 - 30 Min. in einem Ultraschallgerät (Ultrasonic Desintegrator, MSE, London) bei 20000 Hz behandelt (Abb.1). Nach Abzentrifugieren (60 - 90 Min. bei 3000 U/Min.) wurden die desintegrierten Streptokokkenzellwände in physiologischer NaCl gewaschen, in 25 ml 0,01 N HCl + 1 mg Pepsin pro ml aufgeschwemmt und zwei Stunden in 37°C Wasserbad fermentiert. Dann wurde erneut abzentrifugiert, zweimal in NaCl-Lösung gewaschen und das Zellwandsediment mit steriler physiologischer NaCl ebenfalls auf eine optische

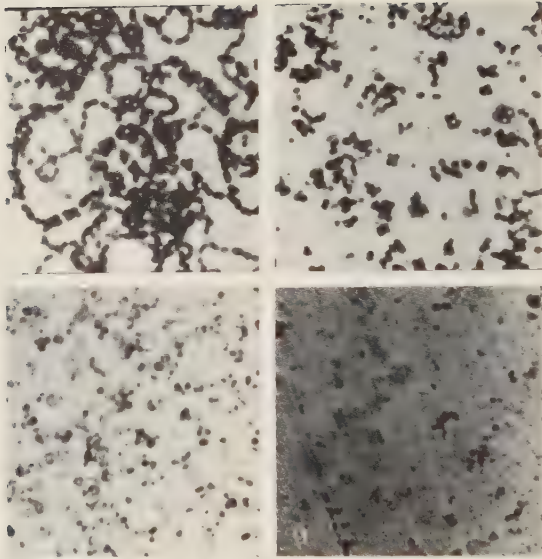


Abb.1 Streptokokken (Gruppe A, Stamm J17/A4) nach 5 Min. (a), 10 Min. (b), 20 Min. (c) und 30 Min. (d) Ultraschall-Behandlung. Gramfärbung. Man erkennt die entsprechend der Dauer der Ultraschall-Einwirkung zunehmende Auflösung der Kettenformation und der Bakterienstruktur. Mikroskop-Vergrößerung 1000 x.

Dichte von 1 eingestellt. Das injektionsfertige, sterile Antigen wurde während des ganzen Immunisierungsvorganges im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt (HEYMER und Mitarbeiter, 1967).

2. Immunisierung der Kaninchen

a) Auswahl der Versuchstiere

Zur Immunisierung wurden ca. 3 kg schwere, 4 - 6 Monate alte Kaninchen eigener Zucht benutzt. Es wurden sowohl männliche wie weibliche, insgesamt 16, Tiere verwendet. Als Futter erhielten sie Altromin-Standard-Diät für Versuchstiere.

b) Immunisierungsschema (LANCEFIELD, 1955)

Es wurden folgende Mengen der Antigensuspensionen inaktivierter β -hämolytischer Streptokokken intravenös injiziert:

1. Woche	3 mal 0,5 ml	an aufeinanderfolgenden Tagen		
	4 Tage Ruhe			
2. Woche	3 mal 1,0 ml	"	"	"
	4 Tage Ruhe			
3. Woche	3 mal 1,0 ml	"	"	"
	4 Tage Ruhe			
4. Woche	3 mal 1,0 ml	"	"	"
	4 Tage Ruhe			

c) Blutentnahme zur Bestimmung der Antikörperbildung während des Immunisierungsvorganges

Jeweils einen Tag vor und am 7., 14., 21. und 28. (zum Teil auch am 35., 42., 48.) Tag nach Immunisationsbeginn wurden aus der Ohr- randvene der Kaninchen einige ml Blut steril entnommen. Die Blut- entnahmen lagen jeweils am 4.Tag nach der letzten vorausgehenden Antigen-Injektion. Kaninchen, deren Serum neben einem hohen Titer im Bakterienagglutinationstest eine 2- bis 3-fach positive Präci- pitinreaktion aufwiesen (s. später), wurden 5 Tage nach der letz- ten Antigen-Injektion entblutet. Falls der Antikörperspiegel nicht zufriedenstellend war, erhielten sie 7 Tage später eine Booster- Injektion von 0,5 ml Antigen-Suspension. 5 Tage danach wurde er-

neut ein Präcipitintest durchgeführt.

d) Gewinnung der Antiseren

Die Tiere wurden unter Beachtung steriler Kautelen durch Herzpunktion entblutet. Um eine Lipämie zu vermeiden, erhielten sie in den letzten 24 Stunden vor der Entblutung keine Nahrung. Meist konnten 80 - 120 ml Blut gewonnen werden. Das Blut wurde, um den Gerinnungsvorgang zu begünstigen, 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend 24 Stunden im Kühlschrank (+ 4°C) aufbewahrt. Das Serum wurde abzentrifugiert, mittels eines Seitzfilters keimfrei gemacht und in Serumflaschen (50 - 100 ml) im Kühlschrank zur weiteren Verwendung verwahrt.

II. Untersuchung der gewonnenen Antiseren

1. Bakterienagglutinationstest (Abb.2)

Als Testbakterien dienten die auch zur Immunisierung verwandten Streptokokkenstämme. Die für den Bakterienagglutinationstest verwendeten Streptokokken wurden in einer Stärke verwendet, die etwa der vierfach verdünnten, injektionsfertigen Antigensuspension entsprach. Geprüft wurden alle unter I.2.b) angegebenen Serumproben. Zunächst wurde mit steriler physiologischer NaCl eine Serumverdünnungsreihe von 1 : 10 bis 1 : 5120 angelegt; dabei war nur 0,1 ml Serum als Ausgangsmenge erforderlich. In jedem von 10 Röhrchen befand sich 0,5 ml NaCl-Serumverdünnung, ein elftes Röhrchen enthielt als Kontrolle nur physiologische NaCl. Durch Zugabe von je 0,5 ml Bakteriensuspension erhöhte sich die Verdünnung auf das Doppelte, d.h. auf 1 : 20 bis 1 : 10240. Alle Röhrchen wurden unter zeitweiligem Schütteln für 5 - 6 Stunden in einem 56°C Wasserbad inkubiert und anschließend 12 Stunden in den Kühlschrank (+ 4°C) gestellt. Am nächsten Tag wurde das Ergebnis - falls erforderlich unter Zuhilfenahme eines Agglutinoskops - abgelesen (KABAT und MAYER, 1964).



Abb. 2 Agglutinationstest (Serum Nr. 1) Verdünnung:
1:160 ; 1:320 ; 1:640 ; 1:1280 ; 1:2560 ; Kontrolle

2. Präcipitationstest (Abb.3)

a) Lancefield-Methode

Der im Präcipitintest verwendete Streptokokkenextrakt wurde nach der Methode von LANCEFIELD (1928) hergestellt. Der betreffende Streptokokkenstamm (J17/A4, T12/126, C74, D166B, 7KK und 196) wurde in 2 Röhrchen mit je 18 ml Todd-Hewitt-Brühe (Difco) inoculiert und für 18 - 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment zweimal mit steriler physiologischer NaCl gewaschen und in ein Zentrifugenröhrchen eingefüllt. Nach Zugabe von 0,5 ml 0,2 N HCl wurde die Streptokokkensuspension unter mehrmaligem Aufschütteln in einem Wasserbad bis auf 100°C erhitzt und anschließend schnell bis auf Zimmertemperatur abgekühlt. Das Gemisch wurde nun zentrifugiert (20 Min. mit 3000 U/Min.), der Überstand dekantiert, mit einem Tropfen Bromthymolblau versetzt und durch Zugabe von 0,2 N NaOH neutralisiert. Die genaue Adjustierung auf pH 7.2 bis 7,4 wurde durch ein Spezial-pH-Papier (Mikro Essentia Lab) kontrolliert. Der sich meist nach zweistündigem Stehen bei Raumtemperatur bildende Niederschlag wurde abzentrifugiert und der die extrahierten gruppenspezifischen Polysaccharide enthaltende Überstand in ein steriles Röhrchen übertragen.

Für den Präcipitintest wurden sterile Kapillarröhrchen von 7,5 cm Länge und 0,7 bis 1 mm Innendurchmesser benutzt. Zuerst wurde jeweils das Antiserum und anschließend eine gleiche Menge Streptokokkenextrakt aufgezogen. Es wurde darauf geachtet, daß sich zwischen Serum und Extrakt keine Luftblase befand.

Die Testkapillare wurden so in eine plastilingefüllte Rinne gestellt, daß sich das Präcipitinogen jeweils über dem Serum befand. Die Reaktion wurde nach 5 - 10 Min. bei Raumtemperatur abgelesen. Bei der Beurteilung der Reaktivität eines Serums wurde neben der Dauer der Präcipitatbildung die Menge des Immunpräcipitates berücksichtigt. Ein eben sichtbares Präcipitat wurde mit einfach positiv (+), stärkere mit zweifach (++) und dreifach positiv (+++) - (Abb. 3) - und ausgesprochen starke Präcipitatbildungen mit vierfach (++++), und fünffach positiv (+++++) bewertet (SWIFT und Mitarbeiter, 1943).



Abb.3 Präcipitationstest: Serum Nr.1 geprüft gegen Ultraschall-Präcipitinogen (a) und Lancefield-Präcipitinogen (b). Bei (a) dreifach positive (+++), bei (b) zweifach positive (++) Reaktion. Als Kontrolle: Anti-Serum ohne Präcipitinogen (c).

b) Ultraschall-Methode

β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A (Stamm J17/A4) wurden in 5 Liter Todd-Hewitt-Brühe 20 Stunden bei 37°C kultiviert, das Sediment zweimal in physiologischer NaCl gewaschen, 30 Min. im 56°C Wasserbad inaktiviert und erneut gewaschen. Das in 8 ml steriler physiologischer NaCl resuspendierte Sediment wurde nun 1 Stunde im Ultraschallgerät (MSE, London) mit 20000 Hz behandelt, die zerstörten Bakterien abzentrifugiert und das Supernat mit 0,1 N steriler HCl auf pH 2 eingestellt. Das ausfallende Material wurde abzentrifugiert, 100 mg kristallines Pepsin dem Supernat zugefügt, die Lösung 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, erneut zentrifugiert und 10 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Das Supernat wurde dekantiert, neutralisiert und 30 Min. mit 30000 U/Min. in der Ultrazentrifuge (Spinco) zentrifugiert. Der Überstand wurde nun lyophilisiert und die nicht kristalline, gefriergetrocknete Substanz in 3 ml steriler physiologischer NaCl gelöst (HEYMER und Mitarbeiter, 1967).

Die Durchführung des Präzipitintestes erfolgte wie unter 3.a) beschrieben.

3. Gesamteiweißbestimmung und Papierelektrophorese

Vor Beginn der Immunisierung und nach deren Ende wurde das Gesamteiweiß jedes Kaninchenserums mit der Biuret-Methode bestimmt und eine Papierelektrophorese (Elphor Integrator) angefertigt.

III. Immunofluoreszenz-Verfahren (Abb.4)

1. Kopplung der Antiseren (Vollseren) und Blockierung

Die Antiseren wurden in Anlehnung an die Methode von MARSHALL und Mitarbeiter (1958) mit Fluorescein-Isothiocyanat (Sylvania Comp. N.Y., USA) konjugiert. Der gesamte Kopplungsvorgang wurde bei +4°C durchgeführt. Zunächst wurde jeweils der Eiweißgehalt mittels der Biuret-Methode bestimmt und jedes Serum auf einen Proteingehalt von 10 mg pro ml verdünnt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente ste-

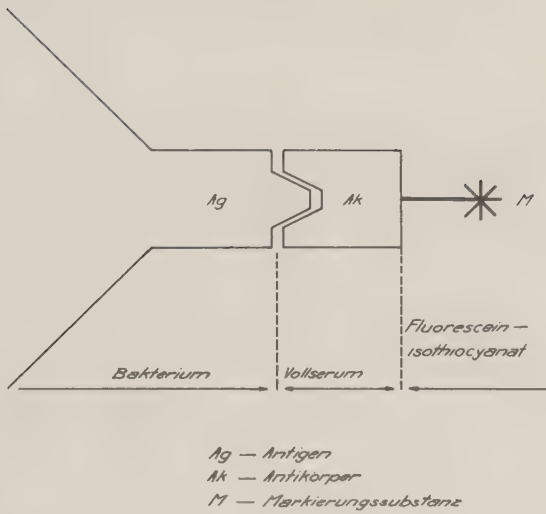


Abb.4 Schematische Darstellung der Immunofluoreszenzreaktion bei Verwendung eines fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten Vollserums (Antiserum) gegen Bakterien (Antigen).

rile physiologische NaCl und 0,5 molarer Carbonat-bicarbonat-Puffer (pH 9,0); der Puffer wurde jeweils in einer Menge zugesetzt, die 10 % des Gesamtvolumens (Serum und Verdünnungsflüssigkeit) entsprach.

Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde nun der Farbstoff Fluorescein-Isothiocyant in einem Verhältnis von 0,05 mg pro mg Eiweiß in der Kühlbox 18 - 24 Stunden mit dem verdünnten Vollserum optimal durchmischt. Anschließend wurde das Konjugat in einen Dialyseschlauch gefüllt und gegen PBS (0,01 M phosphatgepufferte physiologische NaCl, pH 7,2) solange dialysiert, bis in der Spülflüssigkeit kein Fluorescein-Isothiocyant mehr vorhanden war. Das konjugierte Serum wurde mit Hilfe eines Seitz-Filters keimfrei gemacht, steril in Serumflaschen eingefüllt und im Eisschrank (+ 4°C) verwahrt. Verdünnungen von 1:5, 1:10 und 1:20 wurden mit steriler PBS hergestellt. Um Kreuzreaktionen zwischen den gegen Gruppe A, C und G Streptokokken gerichteten Antiseren auszuschalten, wurden zu je 5 ml Konjugat der einen Gruppe je 0,2 ml ungekoppeltes Antiserum der beiden anderen Gruppen zugegeben. Ein solches Vorgehen bewirkt, daß z.B. bei Verwendung eines Anti-A-Konjugates, die in diesem - wenn auch meist in geringer Menge - vorhandenen Anti-C- und Anti-G-Antikörper nicht mit den korrespondierenden Antigendeterminanten reagieren können, da diese durch ungekoppelte Anti-C- und Anti-G-Antikörper abgebunden sind (MOODY und Mitarbeiter, 1962).

2. Ausstrichvorbereitung und Färbung

Vom Sediment der in Todd-Hewitt-Brühe 18 Stunden kultivierten Streptokokken, wurden jeweils 5-6 Tropfen in 1 ml physiologische NaCl suspendiert und je 1 Tropfen auf Objektträgern ausgestrichen. Die Ausstriche wurden im Brutschrank (37°C) getrocknet, anschließend 2 Min. in 96 % Äthylalkohol fixiert und erneut getrocknet. Von dem Konjugat bzw. seinen Verdünnungen wurde ein Tropfen auf jeden Ausstrich gegeben, vorsichtig mit einem Stäbchen ausgebreitet und die Objektträger für eine halbe Stunde in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Das überschüssige Konjugat wurde mit PBS abgespült und die Ausstriche anschließend 10 Min. eben-

falls in PBS gewaschen. Nach vorsichtigem Abtrocknen mit Fließpapier wurde jeder Ausstrich mit gepuffertem Glycerin (pH 8,0 - 8,2; Glycerin + 0,5 molarer Carbonat-bicarbonat-Puffer pH 9) eingedeckt.

3. Kontrollen

Die Spezifität und Stärke der Konjugate wurde an Ausstrichen (wie unter III.2. beschrieben) von bekannten Streptokokkenstämmen der Gruppe A, C und G ausgetestet. Zur Prüfung eines Anti-A-Serums wurden zunächst 2 Ausstriche (Nr.1 und 2) von Gruppe A-, ein Ausstrich (Nr.3) von Gruppe C- und ein weiterer (Nr.4) von Gruppe G-Streptokokken angefertigt. Ausstrich Nr.1, 3 und 4 wurden, wie unter III.2. beschrieben, mit Anti-A-Konjugat überschichtet und inkubiert. Ausstrich Nr.2 wurde zunächst mit ungekoppeltem Anti-A-Serum inkubiert (15 Min., feuchte Kammer), mit PBS abgespült und anschließend mit dem Anti-A-Konjugat wie bei Nr.1, 3 und 4 behandelt.

Bei der beschriebenen Austestung des Anti-A-Konjugates diente als Objektträger Nr.1 zur Beurteilung der Stärke des Konjugates, Objektträger 2,3 und 4 als Kontrollen. Die Behandlung des Ausstrichs Nr.2 entsprach dem von COONS und KAPLAN (1950) angegebenen Zweistufen-Hemmungstest. Objektträger Nr.3 und 4 erlaubten eine Beurteilung der Gruppe A-Spezifität. In einem analogen Vorgehen wurden Anti-C- und Anti-G-Konjugate geprüft. Alle Ausstriche wurden mit einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop, Filter BG 22, BG 12 (2 mm) und GG 9, betrachtet und die Intensität der Fluoreszenz angegeben. Eine fragliche Fluoreszenz wurde mit +-, eine eben sichtbare mit +, eine gut sichtbare mit ++ und eine ausgesprochen starke mit +++ oder ++++ bewertet (Abb.5).

IV. Praktische Anwendung der Immunofluoreszenz-Methode bei der Gruppenbestimmung unbekannter Streptokokkenstämmen

1. Abstrich und Kultur

Bei zahlreichen Versuchspersonen wurden Rachenabstriche entnommen

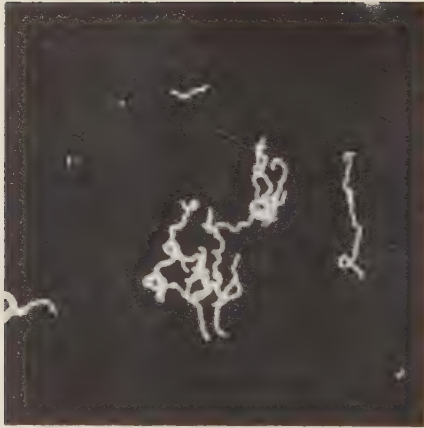


Abb.5 Ausstrich von Streptokokken der Gruppe A (Stamm J17/A4) nach Behandlung mit einem unverdünnten an Fluorescein-isothiocyanat gekoppelten Antiserum gegen Streptokokken der Gruppe A (Serum Nr.3). Im Mikroskop intensive, gelbgrüne, in der Abbildung weiße Fluoreszenz der Streptokokkenketten (Stärke: +++). Mikroskop-Vergrößerung 250 x.

und innerhalb von 4 Stunden im Institut verarbeitet (WILLIAMS, 1958). Die Abstriche wurden in ein Röhrchen mit Todd-Hewitt-Brühe getaucht, an der Wand desselben ausgedrückt, um überflüssige Flüssigkeit zu entfernen und auf einer Blutagarplatte (Tryptose blood agar base, Difco und 7% defibriniertes Schafsblut) ausgestrichen. Mit einer Platinöse wurde weiter ausgestrichen, um eine gute Isolierung der Kolonien zu erreichen. Die Platten wurden 18 - 20 Stunden in CO_2 -Atmosphäre bei 37°C inkubiert und anschließend makroskopisch auf Kolonien β -hämolyzierender Streptokokken untersucht (FRY, 1933; FULLER und MAXTED, 1939; SMITH, 1965). Falls vorhanden, wurden sie in 18 ml Todd-Hewitt-Brühe 4 Stunden kultiviert, durch Zentrifugieren sedimentiert und mit einer Pasteur-Pipette in ca. 1' ml sterile physiologische NaCl übertragen.

2. Immunofluoreszenz

Wie unter III.2. beschrieben, wurden von den kultivierten β -hämolytischen Streptokokken Ausstriche vorbereitet und mit konjugierten Antiseren der Gruppe A, C und G ausgetestet.

C. Ergebnisse

Bei allen 12 Tieren (Kaninchen Nr.1 - 12), die mit dem Antigen aus ganzen Bakterien sensibilisiert worden waren, fanden sich bereits am 7. Tage nach Beginn der intravenösen Injektionen agglutinierende Antikörper gegen β -hämolytische Streptokokken. Die Titer dieser Antikörper erreichten am Ende der 2. Woche einen Höhepunkt, fielen während der 3. Woche meist deutlich ab, um dann erneut anzusteigen (Abb.6).

Ein ganz ähnlicher Verlauf der Antikörperbildung zeigte sich bei den Tieren, welche Injektionen von ultraschall-behandelten Streptokokken erhalten hatten.

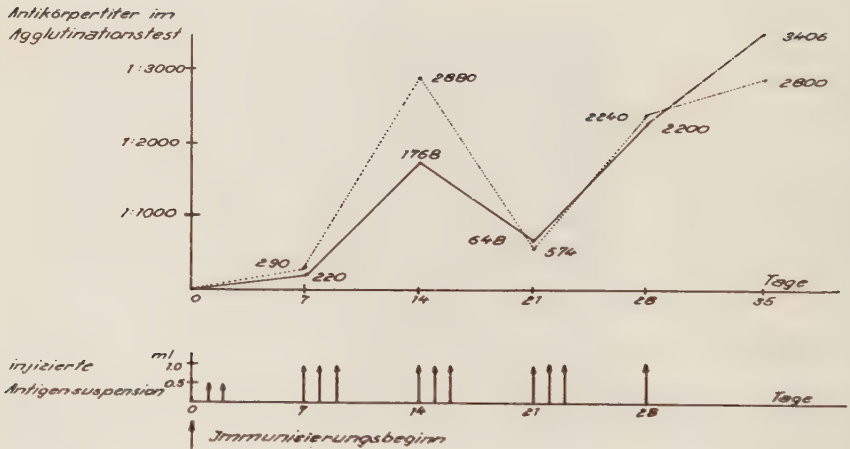


Abb.6 Bildung agglutinierender Antikörper im Verlaufe der Immunisierung. Mittelwerte von 12 Tieren (Kaninchen Nr.1 - 12), immunisiert mit Antigen nach LANCEFIELD (durchgezogene Linie) und 4 Tieren (Kaninchen Nr.13 - 16) mit Antigen nach Ultraschall-Verfahren (punktierte Linie).

Eine weitere Zunahme der Agglutinationstiter konnte durch eine Booster-Injektion acht Tage nach Abschluß der üblichen 28-tägigen Immunisierungsperiode erreicht werden (Abb.6).

Der Vergleich der mit den beiden verschiedenen Antigenen sensibilisierten Tiergruppen ergab hinsichtlich der Bildung agglutinierender Antikörper gewisse Unterschiede. Die nach Injektion des Ultraschall-Antigens nachweisbaren Agglutinine waren während der ersten zwei bis drei Wochen nach Immunisierungsbeginn in höheren Titern nachweisbar, unterschieden sich jedoch am Ende der gesamten Immunisierungsperiode in ihrer absoluten Höhe nicht von denen mit Lancefield-Antigen erzielten. Die Endtiter (28.Tag) der Antisera schwankten zwischen 1:160 und 1:10240, lagen jedoch meist bei 1:1280. Es ergab sich keine Korrelation zwischen dem verwendeten Gruppen-Antigen (A, C oder G) und der erzielten Antikörpermenge.

Im Gegensatz zu den agglutinierenden Antikörpern waren präcipitierende Antikörper bei Verwendung eines Salzsäure-Extraktes aus β -hämolytischen Streptokokken nach LANCEFIELD in beiden Kaninchen-Gruppen erst zwei bis drei Wochen nach Immunisierungsbeginn nachweisbar. Die Stärke der Präcipitinreaktion nahm dann kontinuierlich bis zum Ende der Sensibilisierung zu. Bei Testung der Seren mit einem durch Ultraschall-Extraktion von den β -hämolytischen Streptokokken gewonnenen Präcipitinogen ließen sich bereits sieben Tage nach der ersten Antigen-Injektion, d.h. zum Zeitpunkt des Erscheinens agglutinierender Antikörper, präcipitierende Antikörper feststellen. (Nur Antisera für Gruppe A, C und G nicht geprüft). Darüberhinaus war die Stärke des Ausfalls der Präcipitinreaktion, d.h. die Menge des Präcipitates, zwei- bis dreimal größer als bei Prüfung derselben Seren mit dem nach LANCEFIELD extrahierten Präcipitinogen (Abb.7).

Durch die Sensibilisierung der Kaninchen mit den verschiedenen Streptokokken-Antigenen kam es zu Verschiebungen des Serumeiweißgehaltes, welche in Tabelle 1 zusammengestellt sind.

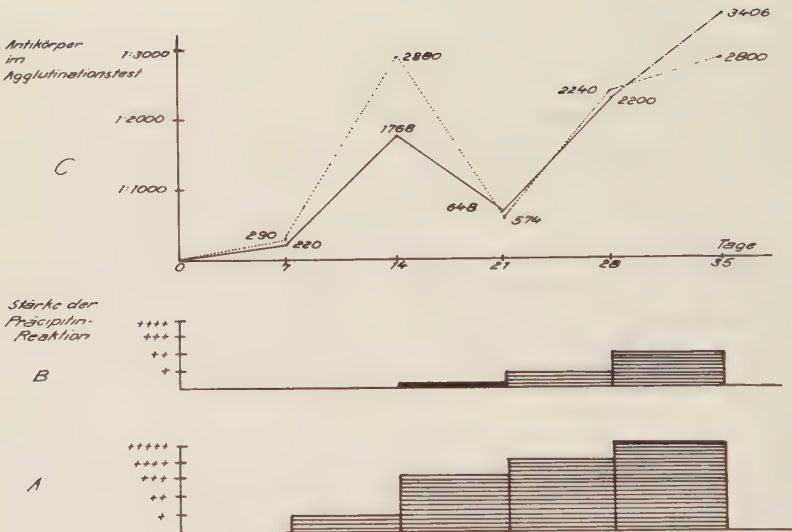


Abb.7 Bildung präzipitierender Antikörper im Laufe der Immunisierung. Nachweis der Antikörper mit einem Ultraschall-Extrakt (A) und mit einem Salzsäure-Extrakt nach LANCE-FIELD (B). Vergleich der Resultate der Präcipitin-Reaktion mit dem Ausfall der Agglutinations-Reaktion (C) (Kaninchen Nr.1 - 16).

Tabelle 1: Untersuchung der Kaninchenseren vor und nach der 28-tägigen Immunisierung. Bestimmung des Agglutinationstiters, der Stärke der Präcipitationsreaktion, der Gesamteiweißmenge und der γ -Globulin-Fraktion

Kan. Nr.	Vor Immunisierung					Nach Immunisierung				
	Agglut. Titer	Präcip. Test	Ges. Eiweiß g%	γ-Globulin rel.%	g%	Agglut. Titer	Präcip. Test	Ges. Eiweiß g%	γ-Globulin rel.%	g%
1	-	-	4,3	11	0,46	1: 1280	++	7,1	15	1,1
2	-	-	5,6	8	0,4	1: 1280	++	6,4	16	1,0
3	-	-	5,3	5	0,26	1: 3840	+	6,2	14	0,86
4	-	-	5,2	6	0,31	1: 10240	+++++	7,6	20	1,52
5	-	-	5,8	11	0,64	1: 320	+	6,1	14	0,85
6	-	-	6,1	12	0,73	1: 2560	+++	8,1	23	1,96
7	-	-	5,3	8	0,42	1: 1600	+++	6,3	16	1,01
8	-	-	6,8	14	0,95	1: 1280	++	8,4	25	2,1
9	-	-	5,9	9	0,53	1: 160	+	6,6	14	0,92
10	-	-	4,9	12	0,59	1: 1280	++	6,7	24	1,61
11	-	-	4,3	6	0,26	1: 1280	+	6,1	15	0,92
12	-	-	4,2	11	0,46	1: 1280	+	4,9	22	1,09
13	-	-	6,1	11	0,67	1: 2560	+	7,3	20	1,46
14	-	-	5,8	9	0,52	1: 2560	++	7,0	19	1,33
15	-	-	8,3	7	0,58	1: 1920	+	8,6	9	0,77
16	-	-	4,9	9	0,44	1: 1920	+	5,1	11	0,56

Es ergab sich bei allen Kaninchen eine mehr oder weniger starke Zunahme des Gesamteiweißes. Die Auswertung der Papierelektrophorese zeigte, daß diese Zunahme hauptsächlich auf eine Vermehrung des γ -Globulinanteils zurückzuführen war. Ein typisches Beispiel für die immunbedingte Veränderung des Serum-Eiweißbildes (Kan. Nr.1) zeigt die Abb.8. Neben der deutlichen Vermehrung der γ -Globuline fällt eine spitzgipflige Umformung der Elektrophorese-Kurve im γ -Globulinbereich auf. Daneben ist auch hier, wie in den meisten anderen Fällen, eine gewisse Vermehrung anderer Serumeiweißfraktionen vorhanden; nur bei den Albuminen kam es unter der Sensibilisierung zu einem Abfall (Abb.9).

Vergleicht man nun den γ -Globulinzuwachs mit der Qualität des jeweiligen Antiserums (Agglutinations-Titer, Ausfall der Präzipitationsreaktion), so zeigt sich, daß sich die stärkste Zunahme der γ -Globulinfraktion meist bei den Seren mit den höchsten Antikörpertitern findet (Serum Nr.3, 4 und 6; Tabelle 1).

Die gruppenspezifische Reaktion der erhaltenen Antiseren ließ sich durch Austestung mit Präcipitinogenen (Salzsäureextrakt nach LANCE-FIELD) anderer Streptokokkengruppen als der zur Immunisierung verwendeten nachweisen⁺) (Tabelle 2). In jedem Falle reagierte das Immunserum bei Anwendung des Kapillärpräcipitintestes nur mit dem spezifischen Antigen.

Bei Verwendung der unverdünnten Vollserum-Konjugate ergab sich in allen Fällen (Serum Nr.1 - 16) eine intensive, gelbgrüne Fluoreszenz der den Antiseren homologen Streptokokken. Jedoch fanden sich zwischen den Antiseren der Gruppen A, C und G deutliche Kreuzreaktionen, die erst bei Konjugatverdünnung von 1:10 bis 1:20 verschwanden. Der dadurch erzielte Gewinn an Spezifität hatte einen Verlust an Fluoreszenzstärke zur Folge. Demgegenüber wurden die gekreuzt reagierenden Antikörper durch Zugabe unmarkierten Antiserums (z.B. zu Konjugat der Gruppe A unmarkiertes Antiserum der

⁺) Das Präcipitinogen der Gruppe B und D wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Th.B. SMITH, Pathologisches Institut der Universität Bonn-Venusberg, überlassen.

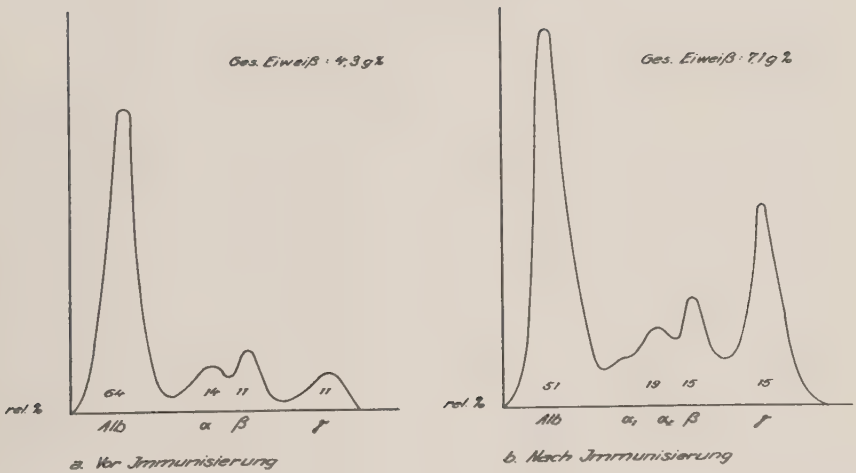


Abb.8 Papierelektrophorese: Serum des Kaninchens Nr.1 vor (a) und nach (b) Immunisierung mit β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A.

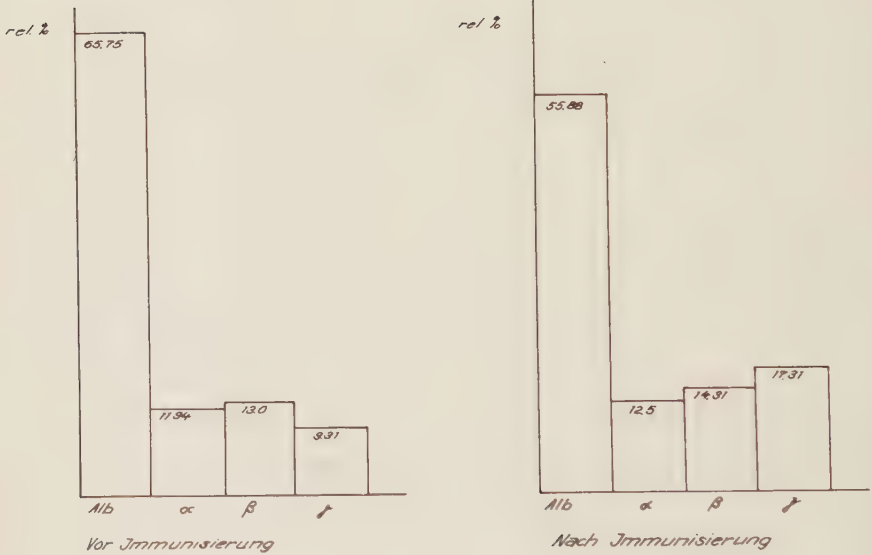


Abb. 9 Mittelwerte der einzelnen Serum-Eiweißfraktionen der Seren Nr. 1 - 16 und nach Immunisierung mit β -hämolytischen Streptokokken.

Tabelle 2: Austestung der gewonnenen Antiseren auf ihre gruppenspezifische Reaktion mit Lancefield-Präcipitinogenen von Gruppe A, B, C, G und D-Streptokokken.

Kan. Nr.	z.Imm. verw. Strept. Stamm	serol. Gruppe	Präcipitinogene der Gruppe				
			A	B	C	G	D
1	J 17/A4	A	+	-	-	-	-
2	J 17/A4	A	+	-	-	-	-
3	J 17/A4	A	+	-	-	-	-
4	T 12/126	A	+	-	-	-	-
5	C74	C	-	-	+	-	-
6	D166B	G	-	-	-	+	-
7	7KK	A	+	-	-	-	-
8	196	A	+	-	-	-	-
9	C74	C	-	-	+	-	-
10	196	A	+	-	-	-	-
11	T 12/126	A	+	-	-	-	-
12	D166B	G	-	-	-	+	-
13	J 17/A4	A	+	-	-	-	-
14	J 17/A4	A	+	-	-	-	-
15	T 12/126	A	+	-	-	-	-
16	J 17/A4	A	+	-	-	-	-

Gruppe C und G) bereits bei den unverdünnten Konjugaten unwirksam; d.h. Gruppe-A-Konjugat reagierte nur noch mit Gruppe A Streptokokken (Tabelle 3).

Die höchsten Titer fluoreszierender Antikörper fanden sich bei A-Konjugaten (Tabelle 3, Serum Nr.3); selbst bei einer Verdünnung des Vollserumkonjugates von 1:20 war noch eine zweifach positive Fluoreszenz zu beobachten.

Bei Überschichten eines gemischten Ausstriches von Streptokokken der Gruppen A, C und G mit dem blockierten und 1:10 verdünnten Anti-A-Konjugat (Serum Nr.3) fand sich nur eine intensive, gelbgrüne Fluoreszenz der A-Streptokokkenketten (Abb.10).

Unter 60 aus dem Rachenbereich von Bonner Schulkindern isolierten β -hämolytischen Streptokokkenstämmen fanden sich mit dem Präcipitintest 36 mal Gruppe A-, 12 mal Gruppe C- und 12 mal Gruppe G-Streptokokken. Bei Prüfung derselben Stämme mit den entsprechenden fluoresceinmarkierten Antiseren wurden 34 dieser 36 Gruppe-A-Stämme richtig als zur Gruppe A gehörig (gleich 94,4 %), 11 der 12 Gruppe-C-Stämme richtig als zur Gruppe C gehörig (gleich 91,63 %) und 10 der 12 Gruppe-G-Stämme richtig als zur Gruppe G gehörig (gleich 83,33 %) identifiziert (Tabelle 4).

Bei den oben erwähnten, aus dem Rachenbereich von Schulkindern isolierten Streptokokken, ließ sich mit der Fluoreszenzmethode innerhalb von 16 - 17 Stunden die Gruppenzugehörigkeit bestimmen. Das dabei erforderliche Vorgehen ist in Abb.11 dargestellt. Im Gegensatz dazu erfordert die übliche Methode (Kultivierung, Unterkultur, Präcipitinogenherstellung, Präcipitintest) mindestens zwei bis drei Tage.

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen in Bezug auf die günstigsten Voraussetzungen für die Herstellung von Hyperimmunseren gegen β -hämolytische Streptokokken beim Kaninchen folgende Schlüsse zu: Das Gewicht der zu sensibilisierenden Tiere sollte nicht unter 3 bis 3,5 kg liegen. Niedrigere Kaninchen-Gewichte führen leicht zu einer Antigen-Überbürdung. Die absolute Antigenmenge und die zeitliche Applikationsmenge ist zur Herstellung von hochtitrigen Anti-

Tabelle 3: Prüfung von Vollserum-Konjugaten der Gruppe A, C und G (Serum Nr.3, 5 und 6) an Ausstrichen von Streptokokken der Gruppe A, C und G hinsichtlich Stärke und Spezifität der Immunofluoreszenzreaktion.

Anti-A-Konjugat (Nr.3)	Stärke der Immunofluoreszenz					
	vor Blockierung			nach Blockierung		
	Strept. der Gruppe			Strept. der Gruppe		
	A	C	G	A	C	G
unverdünnt	++++	++	+-	+++	-	-
1 : 5	+++	+	-	++	-	-
1 : 10	++	-	-	+	-	-
1 : 20	++	-	-	+	-	-
Anti-C-Konjugat (Nr.5)						
unverdünnt	++	++++	+-	-	+++	-
1 : 5	+	+++	-	-	++	-
1 : 10	-	++	-	-	+	-
1 : 20	-	+	-	-	+	-
Anti-G-Konjugat (Nr.6)						
unverdünnt	+-	+	+++	-	-	++
1 : 5	-	+-	++	-	-	+
1 : 10	-	-	+	-	-	+
1 : 20	-	-	+	-	-	+-

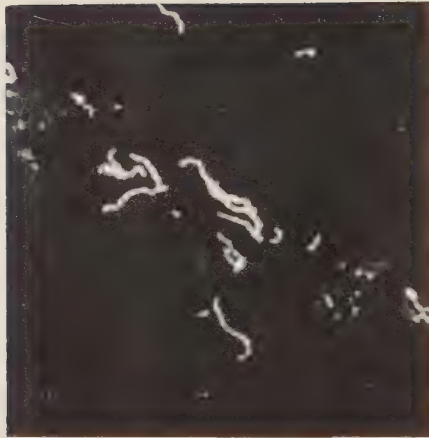


Abb.10 Ausstrich eines Gemisches von Streptokokken der Gruppe A (Stamm J17/A4), C (Stamm C74) und G (Stamm D166B) nach Inkubation mit einem gegen C und G mit der Technik von MOODY und Mitarbeiter (1962) blockierten, 1:5 verdünnten fluoresceinisothiocyanatgekoppelten Anti-Gruppe A-Serum (Serum Nr.3). In der Abbildung weiße, im Mikroskop intensive, gelb-grüne Fluoreszenz nur von Streptokokken der Gruppe A (1); keine Fluoreszenz von C- und G-Streptokokken (2). Mikroskop-Vergrößerung 250 x.

Tabelle 4 Übereinstimmung von Präcipitinreaktion und Immuno-
fluoreszenz-Verfahren bei der Gruppenbestimmung von
60 isolierten Streptokokkenstämmen.

Strepto- kokken- stämme	Präcipitin- test	Fluoreszenz- verfahren	% Über- einstimmung
Gruppe A	36	34	94,40 %
Gruppe C	12	11	91,63 %
Gruppe G	12	10	83,33 %

Schnellmethode zur Gruppenbestimmung
B-hämolytischer Streptokokken

----- Abstrich -----

Auf Blutagarplatte aus- streichen und inkubieren	10 - 12 Std.
Eine isolierte, B-hämolyt. Streptokokken-Kolonie in Nährbrühe übertragen und inkubieren	4 Std.
Zentrifugieren und vorbe- reiten der Ausstriche	20 Min.
Mit Konjugat überschichten und inkubieren	30 Min.
Spülen und eindecken	30 Min.
Ergebnis nach ca.	16 - 17 Std.

seren von größerer Bedeutung als die Präparationsart des Antigens. Nach einer vierwöchigen Sensibilisierungsperiode mit so verschiedenen Antigenen wie dem Ultraschall-Antigen und dem Lancefield-Antigen wurden fast gleichwertige Immunseren gewonnen. Demgegenüber war die Antigenität der verschiedenen Streptokokkengruppen der verschiedenen Streptokokkengruppen offensichtlich unterschiedlich; so entwickelten die meisten Kaninchen nach Injektion von A-Antigenen wesentlich höhere Antikörpertiter als nach C- und G-Antigenen.

D. Diskussion

Die zur Sensibilisierung der Kaninchen verwendeten Antigene wurden nach einem von LANCEFIELD angegebenen (s. Material und Methodik B.I.1b) und nach einem Ultraschall-Verfahren (s.B.I.1c) hergestellt. Es kam mit großer Regelmäßigkeit bei allen Tieren zu starkem Absinken der Agglutinititer in der zweiten bis dritten Woche nach Immunisierungsbeginn (s. Abb.6). Als Erklärung hierfür wäre am ehesten an das Phänomen der immunologischen Überbürdung (GILBERT und EICHHORN, 1960) zu denken: die inzwischen gebildeten humoralen Antikörper werden durch weiter injizierte, große Antigenmengen abgesättigt. Das Ergebnis der Sensibilisierung mit den beiden auf so unterschiedliche Art bereiteten Antigenen war im Endeffekt gleich. Die zweite Beobachtung, nämlich die, daß der Agglutinationstest bereits ein bis zwei Wochen vor dem Präzipitationstest positiv wird (s.Abb.7), ist aus mehreren Gründen leicht verständlich: einerseits ist bekannt, daß für die Agglutinationsreaktion wesentlich kleinere Antikörpermengen als für die Präzipitationsreaktion erforderlich sind (ISLIKER, 1957) und andererseits ist es sehr wahrscheinlich, daß zu Beginn einer Immunisierung mit Streptokokken-Antigenen nur 19S- γ -Globuline als Antikörper, welche nicht präzipitieren, wohl aber agglutinieren, gebildet werden und erst später die Produktion von 7S- γ -Globulin-Antikörpern, welche sowohl präzipitierende als auch agglutinierende Eigenschaften

haben, einsetzt (KRAUSE).

Ein dritter Punkt, der hier zu diskutieren wäre, ist die Abhängigkeit des Nachweises der entstandenen Antikörper im Präcipitintest von der Art des verwendeten Präcipitinogens. Bei Prüfung der Serumproben zu Beginn der Sensibilisierung ließen sich mit ultraschallextrahierten gruppenspezifischen Polysacchariden der Gruppe A Antikörper bereits eine Woche nach Immunisierungsbeginn nachweisen, während das salzsäureextrahierte Antigen erst ein bis zwei Wochen später präcipitierende Antikörper erkennen ließ. Es muß allerdings erwähnt werden, daß die ultraschallextrahierten Streptokokken-C-Substanzen möglicherweise in wesentlich größeren Molekülverbänden vorliegen als das mit der Salzsäuremethode nach LANCE-FIELD gewonnene Präcipitinogen. Das würde bedeuten, daß es sich bei der Reaktion zwischen Ultraschall-Antigen und Antiserum gewissermaßen um eine "Mikroagglutination" handelt. Man wird hier geradezu an die Untersuchungen von MILGROM und LOZA (1967) an Erythrocytenstromata erinnert, die von einer Agglutination korpuskulärer Antigene in Agar Gel unter dem makroskopischen Bilde eines Präcipitates sprachen.

Die im Laufe der Sensibilisierung bei allen Tieren beobachteten Eiweißverschiebungen, insbesondere die Zunahme der γ -Globuline, sind aus Arbeiten zahlreicher Autoren bekannt (TISELIUS und KABAT, 1938; HEYMAN und WAHLIG, 1958 und BJÖRNEBOE und JARNUM, 1961).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Herstellung von Lösungen fluoreszierender Antikörper nur Vollseren herangezogen. Ein derartiges Vorgehen ist nur dann möglich, wenn, was bei der starken Antigenität der gruppenspezifischen Polysaccharide der Streptokokken der Fall ist, hochtitrige Antiseren erzeugt werden können. Wie in den Ergebnissen ausführlich dargestellt, lassen sich derartige Konjugate oft sogar noch erheblich verdünnen, woraus eine Spezifitätszunahme resultiert, da die unspezifische Anfärbung von Zellen und Geweben wegfällt. Im Gegensatz hierzu ist es bei schwächeren Antigenen und entsprechend niedrigtitrigen Antiseren meist unumgänglich die γ -Globulin-Fraktion durch Ausfällung oder Chromatographie zu isolieren, um höhere Antikörperkonzentrationen zu er-

reichen. Im vorliegenden Fall erwies sich die Konjugation der Vollseren als vollkommen ausreichend; es ließ sich praktisch in allen Fällen, wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, ohne weiteres die Gruppenzugehörigkeit des betreffenden Streptokokkenstammes ermitteln. Der Fortfall der γ -Globulinisolierung bzw. die direkte Koppung des Vollserums bedeuten eine erhebliche Arbeits- und Zeiterparnis. Außerdem kommt es wegen der Instabilität der Proteine im Puffer bei längerer Lagerung häufig zum Auftreten von Präcipitaten, die bei Vollserum-Konjugaten seltener zu beobachten sind (SMITH, 1966).

Eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob die Immunofluoreszenz-Methode eine schnellere, zugleich zuverlässige Gruppenbestimmung von β -hämolytischen Streptokokken erlaubt als das übliche serologische Verfahren des Präcipitintests. SMITH gelang es 1965 bei 224 Fällen mit der Fluoreszenz-Methode eine exakte Gruppenbestimmung mit Vollserum-Konjugaten durchzuführen. Aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich, daß es bei 60 Streptokokkenstämmen in 16 - 17 Stunden in einer Genauigkeit von 91,67 % möglich war, die Gruppenzugehörigkeit des entsprechenden Streptokokkenstammes zu bestimmen.

Bei dem Auftreten einer Streptokokken-Angina, die, wie man heute annimmt, die wesentliche Vorerkrankung der akuten hämorrhagischen Glomerulonephritis und des akuten rheumatischen Fiebers darstellt, wäre es mit der vorliegenden Methode also möglich, innerhalb kürzester Zeit zu entscheiden, ob β -hämolytische Streptokokken der Gruppe A vorhanden sind, d.h. ob eine Antibioticatherapie erforderlich ist.

E. Zusammenfassung

Mit zwei verschiedenen Antigenen aus β -hämolytischen Streptokokken der Gruppe A, C und G wurden Kaninchen intravenös sensibilisiert. Die Bildung agglutinierender und präcipitierender Antikörper wurde während des Immunisierungsvorganges durch regelmäßige Blutentnah-

men verfolgt. Bei Verwendung beider Antigenarten kam es jeweils zu einem Anstieg agglutinierender Antikörper bis etwa zum 14.Tag nach Immunisierungsbeginn, einem starken Titerabfall in der dritten Woche und einem zweiten Maximum nach Beendigung der vierwöchigen Immunisierung. Durch eine Booster-Injektion konnte bei beiden Kollektiven der Antikörpertiter weiter angehoben werden. Die sich bildenden Präcipitine wurden mit zwei verschiedenen Polysaccharidextrakten aus β -hämolytischen Streptokokken nachgewiesen. Dabei zeigte sich, daß mit einem nach Ultraschall-Behandlung hergestellten Präcipitinogen Antikörper bereits ein bis zwei Wochen früher nachgewiesen werden konnten als mit dem üblichen Salzsäureextrakt nach LANCEFIELD. Vor und nach der Immunisierung wurden die Seren papier-elektrophoretisch untersucht. Neben einer Zunahme des Gesamteiweißes fand sich meist eine deutliche Vermehrung der γ -Globulinfraktion.

Die gewonnenen Hyperimmunseren wurden mit Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt und mit bekannten Streptokokkenstämmen der Gruppe A, C und G ausgetestet. Durch Blockierung mit nicht markierten Antikörpern entsprechend der Methode von MOODY und Mitarbeiter (1962) und Verdünnung konnte die Spezifität der Vollserumkonjugate erhöht werden. Die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit β -hämolytischer Streptokokken war mit Hilfe der Immunofluoreszenz-Technik in 16 - 17 Stunden durchführbar. 60 Stämme β -hämolytischer Streptokokken der Gruppe A, C und G wurden mit dieser Methode untersucht. In 91,67 % - gemessen am Ergebnis des Präcipitintests - konnten diese Stämme der Gruppe A, C und G mit Hilfe der Immunofluoreszenztechnik richtig als zu diesen Gruppen gehörig bestimmt werden.

F. Literaturangaben

BJÖRNEBOE, M. und S. JARNUM:

The changes in serum proteins and blood volume during immunization.
J. Exp. Med. 113, 1005 (1961)

BURROWS, W.:

Textbook of Microbiology 18th ed.
p 479-506 W.B. Saunders Co., Philadelphia (1963)

CHRIST, P.:

Über die Bedeutung von Streptokokkeninfektionen in der Pathogenese der akuten Polyarthrititis und der akuten Nephritis.
Erg. inn. Med. 11, 379 (1959)

COONS, A. H. and M. H. KAPLAN:

Localization of antigen in tissue cells . II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exp. Med. 91, 1-13 (1950)

EVANS, A. C.:

Studies on hemolytic streptococci. VIII. Streptococcus equisimilis.
J. Bact. 48, 267-284 (1944)

FRY, R. M.:

Anaerobic methods for the identification of haemolytic streptococci.
J. Pathol. Bacteriol. 37, 337-340 (1933)

FULLER, A. T. and W. R. MAXTED:

The production of haemolysin and peroxide by haemolytic streptococci in relation to the nonhaemolytic variants of group A.
J. Pathol. Bacteriol. 49, 83-94 (1939)

GILLERT, K. E. und G. EICHORN:

Über das unterschiedliche Vermögen von Kaninchen präzipitierende Antikörper gegen Humanalbumin zu bilden.
Z. Immun.-Forsch. 119, 430-443 (1960)

HANSBORG, H.:

Examinations about the prognosis of scarlatinal nephritis.
Acta med. Scandinavica 61, 570 (1925)

HEYMAN, G. und H. WAHLIG:

Papierelektrophoretische und ultraviolett-spektro-photometrische Untersuchungen über die Reaktion der Eiweißkörper im Verlauf der Antikörperbildung beim Kaninchen.
Immunforsch. 115, 185 (1958)

- HEYMER, B., Th. B. SMITH und O. HAFERKAMP:
Nachweis von Antikörpern gegen gruppenspezifische Zellwandantigene β -hämolytischer Streptokokken in menschlichen Seren.
I. Herstellung gruppenspezifischer Streptokokken-Antigene und ihre Austestung mit spezifischen Kaninchen Antiseren.
Z. Immun. Forsch. noch im Druck
- ISLIKER, H. C.:
The chemical nature of antibodies.
Advanc. Protein Chem. 12, 387-463 (1957)
- KABAT, E. A. and M. M. MAYER:
Experimental immunochemistry.
p. 114-116 Ch. C. Thomas, Springfield (Ill.) 1964
- KAPLAN, M. H., A. H. COONS and H. W. DEANE:
Localization of antigen in tissue cells.
III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse.
- KRAUSE, R. M.:
Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls.
Bacteriol. Rev. 27, 369-380 (1963)
- KRAUSE, R. M.:
Persönliche Mitteilung (1966)
- LANCEFIELD, R. C.:
The antigenic complex of Streptococcus haemolyticus.
III. Chemical and immunological properties of the species-specific substance
J. Exp. Med. 47, 481 (1928)
- LANCEFIELD, R. C.:
Technical procedures employed in the production and use of streptococcus grouping sera.
pp. 1-5 New York: The Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research (1955)
- MARSHALL, J. D., W. C. EVELAND and C. W. SMITH:
Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 898-900 (1958)
- Mc MILLAN, J. C. jr.:
Seventy-eight hundred scarlet fever patients.
U.S. Nav. Med. Bull. 46, 89 (1946)
- MILGROM, F. and U. LOZA:
Agglutination of Particulate Antigens in Agar Gel.
J. Immunol. 98, 102-109 (1967)

- MOODY, M.D., C.N. BAKER and B. PITTMAN:
Identification of group A streptococci by a simplified
fluorescence inhibition test.
Bacteriol. Proc. p.83 (1962)
- RAMMELKAMP, C.H. jr., F.W. DENNY and L.W. WANNAMAKER:
Studies on the epidemiology of rheumatic fever in the armed
services, in Rheumatic Fever, a Symposium, edited by
L. Thomas University of Minnesota Press Minneapolis (1952)
- SMITH, Th.B.:
Clinical Application of Immunofluorescence.
I. Grouping β -hemolytic Streptococci.
J. of Bact. 89, 198-204 (1965)
- SMITH, Th.B., B. HEYMER, O. HAERKAMP und M. BÖCKELER:
Über die Verbreitung β -hämolytischer Streptokokken im
Mund-Rachenbereich bei Bonner Schulkindern.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 288-299 (1966)
- SMITH, Th.B., B. HEYMER und O. HAERKAMP:
Klinische Anwendung der Immunofluoreszenz.
II. Präparation der für das Immunofluoreszenzverfahren
erforderlichen Reagenzien und Nachweis von im Gewebe lo-
kalisierten Bakterien.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 362-377 (1966)
- SWIFT, H.F., A.T. WILSON and R.C. LANCEFIELD:
Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin
reactions in capillary pipettes.
J. Exp. Med. 78, 127-133 (1943)
- TISELIUS, A. and E.A. KABAT:
Electrophoresis of immune serum.
Science 87, 416 (1938)
- WAHRER, C.F.:
An epidemic of hemorrhagic nephritis following scarlet
fever.
J.A.M.A. 51, 1410 (1908)
- WILLIAMS, R.E.O.:
Laboratory diagnosis of streptococcal infections.
Bull. World Health Organ. 19, 153-176 (1958)

Für die Überlassung des Themas und für seine großzügige und hilfreiche Unterstützung möchte ich Herrn Professor Dr. O. H a f e r k a m p danken.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. H. H a m p e r l für die Übernahme des Korreferates.

L e b e n s l a u f

Am 21.5.1940 wurde ich als erstes Kind des Zahnarztes Dr. Hans S o n n t a g und seiner Ehefrau Maria geb. Beeretz in Geilenkirchen geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Bad Godesberg - Rüngsdorf, wechselte dann auf das naturwissenschaftliche Gymnasium, Pädagogium Otto - Kühne, in Bad Godesberg über, welches ich 1961 mit der Reifeprüfung abschloß.

Nach Ableistung meines Grundwehrdienstes begann ich im Sommer 1962 mit dem Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn. Am 24.4.1963 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 24.4.1965 die ärztliche Vorprüfung. Nach sechs klinischen Semestern beendete ich am 10.7.1968 die ärztliche Prüfung an derselben Universität.

Mit meiner Medizinalassistentenausbildung begann ich am 15.7.1968 in der chirurgischen Abteilung des St. Josef Hospitals in Troisdorf, wo ich zur Zeit noch tätig bin.

